

## Raport științific

### Etapa 1. Dezvoltarea, caracterizarea și analiza *in vitro* a activității antioxidante a produsului gemoterapic pe bază de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine

#### Rezumatul etapei:

În etapa I s-a realizat dezvoltarea, caracterizarea și evaluarea capacității antioxidante a unui nou produs pe bază de extract gemoterapic de seară (*Secale cereale* MG) (SC) îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (SC-CHR/RAMEB și SC-CHR/HPBCD). **Activitatea 1.1.** a fost reprezentată de obținerea și caracterizarea extractului gemoterapic din radicele de seară. Cantitatea de flavonoide a prezentat o creștere semnificativă în cazul extractelor gemoterapice de seară îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine în raport cu extractul gemoterapic de seară necomplexat cu crisină și ciclodextrine. Extractul gemoterapic de seară complexat cu crisină și ciclodextrina RAMEB (SC-CHR/RAMEB) s-a dovedit a avea o concentrație mai mare atât de polifenoli, cât și de flavonoide totale în raport cu extractul gemoterapic de seară complexat cu crisină și HPBCD. În ceea ce privește polifenolii totali, aceștia au fost prezenți în cantitate ușor mai ridicată în cazul extractului gemoterapic de seară necomplexat cu crisină și ciclodextrine. În cadrul **Activității 1.2.**, au fost obținute și caracterizate nanocomplexele de crisină/ciclodextrine. Crisina a fost formulată cu două  $\beta$ -ciclodextrine, respectiv *randomly metilat*  $\beta$ -ciclodextrina (RAMEB) și *hidroxipropil*  $\beta$ -ciclodextrina (HPBCD) în vederea formării de complexe de incluziune. **Activitatea 1.3.** a vizat obținerea și caracterizarea noului produs gemoterapic pe bază de *Secale cereale*, îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (SC-CHR/Cyclo). Analiza LC/MS a relevat faptul că extractul gemoterapic de seară are în compoziție o gamă variată de polifenoli, atât acizi fenolici, cât și flavonoide. În ceea ce privește acizii fenolici, concentrațiile cele mai ridicate au fost de acid cafeic și acid *trans-p*-cumaric. Flavonoidele care au fost identificate în cantitate mai mare au fost reprezentate de hiperoxidă, rutoxidă, naringenină și crisină. În cazul extractului gemoterapic de seară îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine, acizii fenolici nu au putut fi detectați. În schimb, flavonoidele sunt regăsite, ceea ce evidențiază creșterea biodisponibilității în cazul complexării acestora cu ciclodextrinele. Dintre flavonoidele identificate, crisina a fost găsită a fi în cea mai mare concentrație în cazul ambelor preparate fitoterapeutice pe bază de seară îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine. În cadrul **Activității 1.4.**, a fost evaluată activitatea antioxidantă atât a extractului gemoterapic de seară, cât și al extractului gemoterapic de seară îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine prin mai multe metode spectrale: DPPH calculând IC<sub>50</sub>, FRAP și CUPRAC. S-a remarcat prezența unui potențial antioxidant mai mare în cazul extractelor gemoterapice de seară îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine. În **Activitatea 1.5.** a fost selectat pentru realizarea experimentului *in vivo* cel mai bun produs gemoterapic pe bază de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine pe baza rezultatelor obținute *in vitro*, respectiv extractul gemoterapic de seară complexat cu crisină și ciclodextrina HPBCD (SC-CHR/HPBCD). Ultima **Activitate 1.6.**, a presupus diseminarea rezultatelor sub forma a două prezentări orale la conferințe naționale/internaționale.

## Descrierea științifică

### Activitatea 1.1. Obținerea și caracterizarea extractului gemoterapic pe bază de *Secale cereale*

S-a folosit extract gemoterapic din radicele de seară (*Secale cereale* MG), obținut din radicele proaspete recoltate în iulie 2021 din culturile organice ale firmei SC PlantExtrakt SRL (certificare EcoInspect Ro008) prin metodologia descrisă în Farmacopeea Europeană ed. 10. Pentru extracție s-a folosit un amestec glicerină 100% - alcool etilic 96% vol. în raport 1:1, iar raportul de extracție material vegetal uscat – solvent a fost de 1:20. Materialul vegetal s-a prelucrat în stare proaspătă. Extracția s-a realizat la rece, prin macerare cu agitări zilnice de 2 x 20 min, timp de 20 de zile, urmat de decantare și presarea materialului vegetal îmbibat cu solvent la maxim 400 atm. Soluția extractivă astfel obținută este maceratul glicerinic, denumit și extract gemoterapic.

### Activitatea 1.2. Obținerea și caracterizarea nanocomplexelor de crisină/ciclodextrine

Crisina a fost formulată cu două  $\beta$ -ciclodextrine, respectiv *randomly metilat*  $\beta$ -ciclodextrina (RAMEB) și *hidroxipropil*  $\beta$ -ciclodextrina (HPBCD) în vederea formării de complexe de incluziune.

### Activitatea 1.3. Obținerea și caracterizarea noului produs gemoterapic pe bază de *Secale cereale*, îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (SC-CHR/Cyclo)

Extractul gemoterapic din radicele de seară a fost amestecat cu complexe crisină-RAMEB (CHR-RAMEB) și crisină-HPBCD (CHR-HPBCD). S-au realizat complexe lichide fără a folosi vreun stabilizator.

SC = extract gemoterapic din radicele de seară – *Secale cereale* MG

SC-CHR/RAMEB = extract din radicele de seară + CHR-RAMEB complex

SC-CHR/HPBCD = extract din radicele de seară + CHR-HPBCD complex

#### 1.3.1. Evaluarea profilului fitochimic al extractului

##### Dozarea spectrofotometrică a flavonoidelor totale și a polifenolilor totali

Dozarea spectrofotometrică a flavonoidelor se bazează pe reacția de complexare a ionului aluminiu de către grupările cu oxigen din molecula flavonoidelor, complex care se colorează în galben. Metoda este adaptată din Farmacopeea Română ed. X.

Condițiile experimentale sunt:

Aparat: spectrofotometru Cintra 101, GBC Australia.

Probele: câte 1 ml din cele 3 probe se amestecă cu 5 ml acetat de sodiu 10% și 3 ml clorură de aluminiu 2,5%, apoi se completează la 25 ml cu metanol.

Etaloane: câte 1 ml din soluții metanolice de cvercetină având concentrațiile de 2,24; 6,72; 11,20; 15,68 respectiv 22,40  $\mu\text{g/ml}$  se amestecă cu 5 ml acetat de sodiu 10 % și 3 ml clorură de aluminiu 2,5%, apoi se completează la 25 ml cu metanol.

Blank probe: câte 1 ml din cele 3 probe se amestecă cu 8 ml apă purificată, apoi se completează la 25 ml cu metanol.

Blank etaloane: 8 ml apă purificată adusă la 25 ml cu metanol.

Lungimea de undă: 430 nm, citire după 30 minute de repaus.

Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor se bazează pe realizarea unui complex albastru între grupările fenolice și reactivul fosfowolframic în mediu alcalin. Metoda este adaptată din Farmacopeea Română ed. IX.

Condițiile experimentale sunt:

Aparat: spectrofotometru Cintra 101, GBC Australia.

Probele: câte 1 ml din cele 3 probe se amestecă cu 0,5 ml reactiv fosfowolframic, apoi se completează la 25 ml cu carbonat de sodiu 15%.

Etaloane: câte 0,1 ml din soluții metanolice de acid cafeic având concentrațiile de 12, 20, 28 respectiv 40  $\mu\text{g/ml}$  se amestecă cu 0,5 ml reactiv fosfowolframic, apoi se completează la 25 ml cu carbonat de sodiu 15%.

Blank probe: câte 1 ml din cele 3 probe se completează la 25 ml cu carbonat de sodiu 15%.

Blank etaloane: apă purificată.

Lungimea de undă: 715 nm, citire după 2 minute de repaus.

Fiecare probă s-a prelucrat de 3 ori și s-au realizat pe fiecare probă câte 3 citiri. Rezultatele sunt media aritmetică a determinărilor individuale.

În figurile 1 și 2 sunt prezentate curbele de calibrare în cvercetină respectiv acid cafeic, iar în tabelul 1 rezultatele analizelor cantitative spectrale.

Cantitatea de flavonoide a prezentat o creștere semnificativă în cazul extractelor gemoterapice de seară îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine în raport cu extractul gemoterapic de seară necomplexat cu crisină și ciclodextrine. Extractul gemoterapic de seară complexat cu crisină și ciclodextrina RAMEB (SC-CHR/RAMEB) s-a dovedit a avea o concentrație mai mare atât de polifenoli, cât și de flavonoide totale în raport cu extractul gemoterapic de seară complexat cu crisină și HPBCD. În ceea ce privește polifenolii totali, aceștia au fost prezenți în cantitate ușor mai ridicată în cazul extractului gemoterapic de seară necomplexat cu crisină și ciclodextrine.

### 1.3.2. Analiza cromatografică pe coloană

Analiza LC/MS s-a realizat cu un sistem cromatografic Shimadzu Nexera I LC/MS - 8045 (Kyoto, Japan), care este un sistem UHPLC echipat cu pompă cuaternară și un spectrometru de masă cu cvadropoli și ionizare prin pulverizare electronică (ESI).

Separarea s-a realizat pe o coloană Luna C18 cu fază inversă (150 mm x 4.6 mm x 3  $\mu\text{m}$ , 100 Å), de la Phenomenex (Torrance, CA, USA). Temperatura de operare a coloanei a fost de 40°C. Pentru separarea a cât mai mulți polifenoli s-a folosit un gradient de fază mobilă (tabel 2), folosind metanol (Merck, Darmstadt, Germania), apă ultrapurificată preparată cu un sistem Simplicity Ultra Pure Water Purification System (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) și acid formic, ca și modifier organic (Merck, Darmstadt, Germania). Solvenții folosiți au fost de puritate LC/MS. Faza mobilă a fost trecută prin coloana cromatografică cu o viteză de 0,5 ml/min, iar timpul total de analiză a fost de 35 minute.

Detecția componentelor s-a realizat cu un spectrometru de masă cu cvadropoli având sursa de ioni cu electrospray (ESI). Pentru monitorizarea reacțiilor multiple (MRM), pentru detectarea cu sensibilitate maximă, s-a folosit atât modul negativ, cât și modul pozitiv de detectare. Temperatura interfeței a fost de 300°C, gazul de uscure a fost azotul la 35 psi, 10 l/min, iar potențialul de capilar a fost setat la +3000 V.

Ca și standarde s-au folosit polifenolii din tabelul 3. În cazul fiecărui standard, la fiecare concentrație s-au injectat câte 1  $\mu\text{l}$ . Identificarea s-a realizat prin compararea timpilor de retenție, a spectrelor de masă respectiv a tranzițiilor principale din aceste spectre a substanțelor standard cu cele ale compușilor separați din probele analizate. Determinările cantitative s-au realizat pe baza curbelor de calibrare a fiecărei substanțe standard, la nivelul tranziției principale. În acest sens pentru fiecare standard s-a determinat limita de detecție respectiv limita de cuantificare. În tabelul 4 sunt date detaliile din spectrele de masă.

Extractul de *Secale cereale* MG și cele îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine s-au diluat cu metanol, identic cu cel folosit la analiza LC/MS, în raport 1 la 10. Soluțiile diluate s-au trecut prin microfilter de 0,45  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Din fiecare probă de extract simplu s-au injectat câte 1  $\mu\text{l}$ , iar din extractele îmbogățite câte 10  $\mu\text{l}$ .

În figurile 3-5 sunt prezentate cromatogramele LC/MS, spectrele de masă și curbele de calibrare obținute pentru standarde.

În figurile 6-11 sunt prezentate cromatogramele LC/MS ale probelor studiate respectiv spectrele de masa ale polifenolilor identificați și cuantificați. Rezultatele datelor determinărilor cantitative sunt prezentate în tabelul 5.

Analiza LC/MS a relevat faptul că extractul gemoterapic de seară are în compoziție o gamă variată de polifenoli, atât acizi fenolici, cât și flavonoide. În ceea ce privește acizii fenolici, concentrațiile cele mai ridicate au fost de acid cafeic și acid *trans-p*-cumaric. Flavonoidele care au fost identificate în cantitate mai mare au fost reprezentate de hiperozidă, rutozidă, naringenină și crisină. În cazul extractului gemoterapic de seară îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine, acizii fenolici nu au putut fi detectați. În schimb, flavonoidele sunt regășibile, ceea ce evidențiază creșterea biodisponibilității în cazul complexării acestora cu ciclodextrinele. Dintre flavonoidele identificate, crisina a fost găsită a fi în cea mai mare concentrație în cazul ambelor preparate fitoterapeutice pe bază de seară îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine.

#### **Activitatea 1.4. Analiza *in vitro* a activității antioxidante**

Efectul antioxidant al extractelor gemoterapice de seară este probabil datorat conținutului în polifenoli de tipul flavonoidelor și acizilor fenolici. Efectul antioxidant al extractului gemoterapic de seară și al extractului gemoterapic de seară îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine s-a evidențiat prin mai multe metode spectrale: DPPH calculând IC<sub>50</sub>, FRAP și CUPRAC, folosind metodele standard.

În tabelul 6 sunt prezentate rezultatele obținute.

Se observă un potențial antioxidant mai mare în cazul extractelor gemoterapice de seară îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine, potențial care a fost confirmat prin toate cele trei metode utilizate.

#### **Activitatea 1.5. Selectarea celui mai eficient extract gemoterapic pe bază de *Secale cereale*, îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrină în vederea testării *in vivo***

Pe baza rezultatelor obținute *in vitro*, a fost selectat pentru realizarea experimentului *in vivo* cel mai bun produs gemoterapic pe bază de *Secale cereale* îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine, respectiv extractul gemoterapic de seară complexat cu crisină și ciclodextrina HPBCD (SC-CHR/HPBCD).

#### **Activitatea 1.6. Diseminare**

Participare la conferințe naționale/internaționale:

1. **Ciceu A**, Fenyvesi F, Olah N, Hermenean A, *Cellular and molecular pathways involved in liver fibrosis and the potential anti-fibrotic role of Secale cereale extract reinforced with chrysin/cyclodextrin nanocomplexes*, Arad Academic Days, XXXII-nd Edition, May 25-29, 2022, ISBN 978-973-664-920-2 – Prezentare orală
2. **Ciceu A**, Fenyvesi F, Olah N, Hermenean A, *Patogeneza fibrozei hepatice și potențialul efectelor antifibrotice al extractului de Secale cereale îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine*, Școala de Primăvară de Gemmaeterapie, Arad, 3-5 iunie 2022 – Prezentare orală

#### **Gradul de realizare a obiectivelor**

**Obiectiv 1.** Dezvoltarea unui nou produs gemoterapic pe bază de *Secale cereale*, îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (SC-CHR/Cyclo). – Activitățile: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 – Etapa 1 (2002) – grad de realizare 100%

În ceea ce privește **livrabilele realizate**, în această primă etapă s-au obținut

- un extract gemoterapic de *Secale cereale* (Activitatea 1.1.);
- două tipuri de nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (Activitatea 1.2.);
- patru tipuri de extracte SC-CHR/Cyclo care urmează să fie evaluate prin experimente *in vitro* (Activitatea 1.3.);
- evaluarea activității antioxidante a SC-CHR/Cyclo (Activitatea 1.4.);
- selectarea extractului SC-CHR/HPBCD pentru testarea acestuia *in vivo* (Activitatea 1.5.).

**Indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor:**

Participarea la 2 conferințe naționale/internaționale.

Director proiect,  
Dr. Alina Ciceu